

Rec'd PCT/PTO 24 FEB 2005

10/525626

PCT/JP 03/10394

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

18.08.03

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

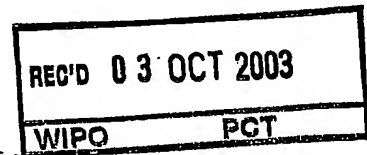
This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2002年 8月29日

出 願 番 号
Application Number: 特願2002-251616

[ST. 10/C]: [JP2002-251616]

出 願 人
Applicant(s): 東洋紡績株式会社
株式会社タクマ



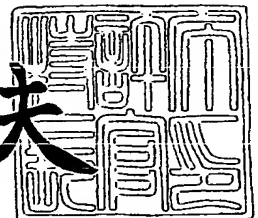
BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 9月19日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 61702JP

【提出日】 平成14年 8月29日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 G01N 33/53

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

【氏名】 西井 重明

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

【氏名】 松井 一裕

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

【氏名】 石橋 卓也

【発明者】

【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町10番24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ研究所内

【氏名】 岡 正則

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市荒井町新浜1丁目2番1号 株式会社タクマ内

【氏名】 藤平 弘樹

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市荒井町新浜1丁目2番1号 株式会社タクマ内

【氏名】 三嶋 弘次

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県高砂市荒井町新浜1丁目2番1号 株式会社タク
マ内

【氏名】 片岡 静夫

【特許出願人】

【識別番号】 000003160

【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社

【特許出願人】

【識別番号】 000133032

【氏名又は名称】 株式会社タクマ

【代理人】

【識別番号】 100065215

【弁理士】

【氏名又は名称】 三枝 英二

【電話番号】 06-6203-0941

【選任した代理人】

【識別番号】 100076510

【弁理士】

【氏名又は名称】 掛樋 悠路

【選任した代理人】

【識別番号】 100086427

【弁理士】

【氏名又は名称】 小原 健志

【選任した代理人】

【識別番号】 100090066

【弁理士】

【氏名又は名称】 中川 博司

【選任した代理人】

【識別番号】 100094101

【弁理士】

【氏名又は名称】 館 泰光

【選任した代理人】

【識別番号】 100099988

【弁理士】

【氏名又は名称】 斎藤 健治

【選任した代理人】

【識別番号】 100105821

【弁理士】

【氏名又は名称】 藤井 淳

【選任した代理人】

【識別番号】 100099911

【弁理士】

【氏名又は名称】 関 仁士

【選任した代理人】

【識別番号】 100108084

【弁理士】

【氏名又は名称】 中野 睦子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 001616

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9709328

【プルーフの要否】 要

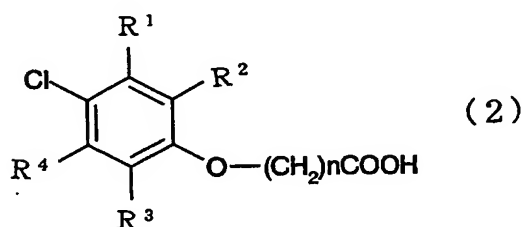
【書類名】 明細書

【発明の名称】 ダイオキシン類の免疫測定用標準品及びダイオキシン類の免疫測定法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 以下の一般式 (2) で表される化合物。

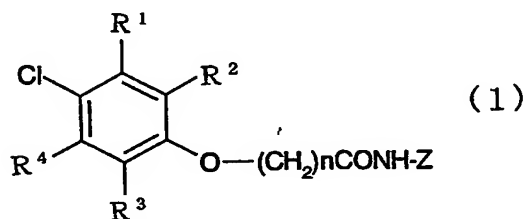
【化 1】



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 n は1～10の整数を表す。)

【請求項 2】 以下の一般式 (1) で表される化合物。

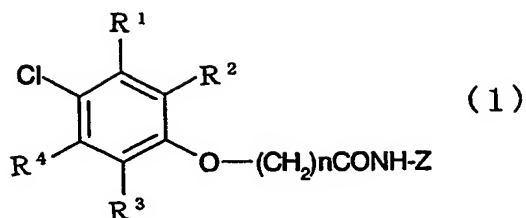
【化 2】



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 n は1～10の整数を表し、 Z はアミノ酸残基又はペプチドを表す。)

【請求項 3】 以下の一般式 (1) で表されるダイオキシン類の免疫測定用標準品。

【化3】



(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 n は1～10の整数を表し、 Z はアミノ酸残基又はペプチドを表す。

)

【請求項4】 ダイオキシン類を検出又は定量するための免疫測定法であって、請求項2に記載の化合物を標準品として用いる方法。

【請求項5】 環境試料中のダイオキシン類の濃度又は毒性等量を算出するための免疫測定法であって、請求項2に記載の化合物を標準品として用いる方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、ダイオキシン類の免疫測定に供される標準品に関する。また本発明は、この標準品を用いたダイオキシン類の免疫測定法、さらに詳しくは、大気、排ガス、土壌、河川、燃焼灰中のダイオキシン類の濃度または毒性等量（TEQ）を、ダイオキシンアナログを標準品として用いることにより算出する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ダイオキシン類とは、ポリ塩素化ジベンゾー

ダイオキシン類（polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins：PCDDs）、ポリ塩素化ジベンゾフラン類（polychlorinated dibenzofurans：PCDFs）、及びコプラナーPCB（coplanar polychlorinated biphenyl：Co-PCBs）の総称で

ある。これら3種類の骨格構造について、塩素置換位置の異なる多数の異性体群が存在する。このうち、PCDDs及びPCDFsでは、2、3、7及び8位に塩素置換がある異性体は強い毒性を有しており、塩素による皮膚炎、多発性神経症、眼球振とう症、肝機能不全などの症状を引き起こすことが知られている。

【0003】

また、低濃度のダイオキシンであっても長期間曝露することにより、晩発性皮膚ポルフィリン症などの慢性的な症状を引き起こす他、催奇形性、発ガン性、助ガン性といった多種多様な毒性を示すことも知られている。

【0004】

更に、近年、人や野生動物の内分泌機能を攪乱する作用を持つ、いわゆる「内分泌攪乱物質」が世界的な環境問題としてクローズアップされている。ダイオキシン類もエストロゲン活性を有する内分泌攪乱物質の一つである疑いがあることも判明している。

【0005】

このように様々な毒性を持つダイオキシン類が、除草剤や殺虫剤などの化学製品、ゴミ焼却場から出る排ガスやフライアッシュ、製紙工場から排出される廃水の中などに含まれていることが明らかとされている。このため、大都市周辺の河川や港湾の水質や底質、大気、土壌といった環境試料のみならず、食品、血液、母乳、尿といった生体試料からもダイオキシン類が検出されている。このように、汚染が環境中に広範囲に広がっていることが大きな社会問題になっていることから、環境中のダイオキシン類暴露量を把握することが急務である。

【0006】

ダイオキシン類の測定は精度の高い分析値が要求される。このため、各種のクロマトグラフィーにより、ダイオキシン類を抽出、濃縮、精製した後、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計などの高価な分析装置等の機器を用いる公定分析法が採用されている。これらの分析法は高感度であるとともに、複数の化合物を一度に同定、定量できる多成分分析が可能である。その反面、高価で特殊な機器やクリーンルーム等の設備投資が必要であること、分析にも熟練した技術者が求められること、前処理の煩雑さのために結果を得るまでに時間がかかること等の難

点があるのが現状である。

【0007】

このため、精度が高くかつ簡便なダイオキシン類の測定方法の開発が望まれている。このような問題を解決すべく、抗体を用いた免疫測定法による環境汚染物質の検出技術が注目されている。

【0008】

免疫測定法とは、抗体が抗原を特異的に認識する能力を用いて微量の抗原を検出又は定量する方法であり、抗体の抗原に対する高い親和性と高い特異性により抗原を高感度に測定することができる。このため、試料の前処理も簡便であり、多検体の測定を簡易かつ迅速に行なうことができ、測定に要するコストが低いといった種々のメリットを持ち、医学、生化学、薬学、農学など広い分野で利用されている。免疫測定法において測定対象物質を検出又は定量するには、抗体または抗原を標識する必要がある種々の標識法が開発されている。中でも酵素を用いた酵素免疫測定法（EIA）は、その簡便性から臨床検査や生化学分野での生体試料中の目的成分の定量に広く応用されている。EIAは、抗原抗体反応の形式により、競合法と非競合法に大別できるが、ダイオキシン類のような低分子化合物は競合法によって測定される。

【0009】

EIAにおいては、測定対象と同じ化合物を標準品に用いて検体と同様に測定し、得られた標準曲線から試料中の化合物濃度を算出する。しかしながら、ダイオキシン類は3種の基本骨格を有する化合物群についての塩素置換数の異なった異性体類の総称であるため、どの化合物を標準品にするかが問題となる。

【0010】

ダイオキシン類の毒性は各同族体及び異性体により異なるため、毒性の異なる同族体及び異性体の混合物であるダイオキシン類の毒性の強さは、個々の異性体の存在比率に依存することになり、単純に各異性体量を合計しても、ダイオキシン類の毒性を正しく表現したことにはならない。

【0011】

これまでに開発されたダイオキシンEIA測定系の多くは、最も毒性が高い2

, 3, 7, 8-テトラクロロジベンゾ-p-ダイオキシン (2, 3, 7, 8-TeCDD) を標準試料として用いている (Anal. Chem. 70, 1092-1099)。各異性体の毒性は、2, 3, 7, 8-TeCDDの毒性を1としこれに対する相対値である毒性等価係数 (TEF: Toxic Equivalency Factor) で表される。さらに、個々の異性体ごとにその存在量にTEFを乗じて得られる毒性量を算出する。これが、測定対象に含まれる全ての異性体の全毒性量である毒性等量 (TEQ: Toxic Equivalent) である。

【0012】

したがって、2, 3, 7, 8-TeCDDを主に測定するEIA測定系では、ダイオキシン類の毒性を正確に測定できる系とは言い難い。特にダイオキシン類の主要な発生源である廃棄物焼却炉から排出されるガス中のダイオキシン類毒性等量 (TEQ) は、2, 3, 7, 8-TeCDDよりも、五塩素化ジベンゾフラン濃度又は六塩素化ジベンゾフラン濃度と相関が高いことが知られている。また、排ガス試料を分析対象とした場合、これまでのEIA測定系では、機器分析値と大きくかけ離れる場合がある。このように、EIA測定系は、使用に制限が生じる可能性がある。

【0013】

また、EIAにおいて、2, 3, 7, 8-TeCDDやその他のダイオキシン類異性体を標準品に用いる場合は、標準品調製時に毒性の高い化合物を取り扱うことになるため、測定者側の安全性確保及び作業時の精神的な負担等の問題を有している。

【0014】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、ダイオキシン類の免疫測定用標準品であって毒性等価係数 (TEF) を有さない標準品、及び、この標準品を用いて環境試料中のダイオキシン類濃度または毒性等量を簡便かつ高感度に測定できる免疫測定法を提供することである。

【0015】

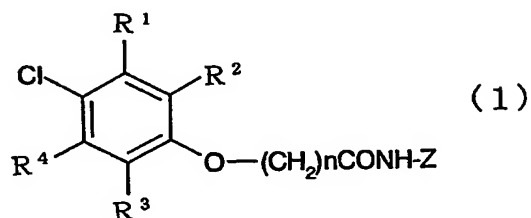
【発明を解決するための手段】

本発明者は、上記事情に鑑み、鋭意検討した結果、以下の知見を得た。

① 下記一般式(1)で表されるクロロフェノール誘導体

【0016】

【化4】



【0017】

(式中、R¹、R²、R³、R⁴は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、nは1～10の整数を表し、Zはアミノ酸残基又はペプチドを表す。)

は、ダイオキシン類の免疫測定用標準品として好適に使用できる。

② このクロロフェノール誘導体は毒性等価係数(TEF)を有さないため、この化合物をダイオキシン測定用標準品として用いることにより、安全に環境試料中のダイオキシン類濃度及び毒性等量を算出できる。

【0018】

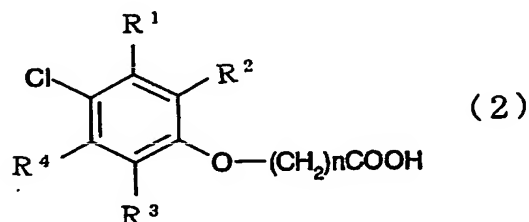
本発明は前記知見に基づき完成されたものであり、以下の化合物などを提供する。

【0019】

項1. 以下の一般式(2)で表される化合物。

【0020】

【化5】



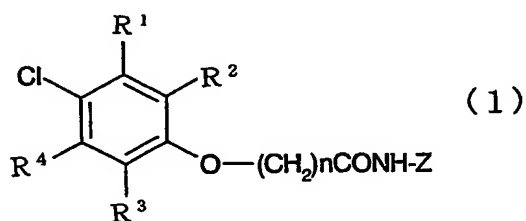
【0021】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 n は1～10の整数を表す。)

項2. 以下の一般式(1)で表される化合物。

【0022】

【化6】



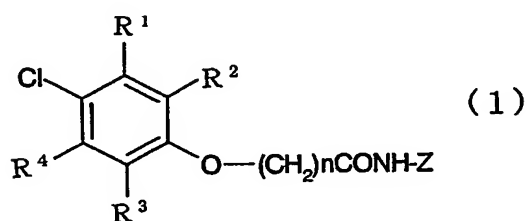
【0023】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 n は1～10の整数を表し、 Z はアミノ酸残基又はペプチドを表す。)

項3. 以下の一般式(1)で表されるダイオキシン類の免疫測定用標準品。

【0024】

【化7】



【0025】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 n は1～10の整数を表し、 Z はアミノ酸残基又はペプチドを表す。)

項4. ダイオキシン類を検出又は定量するための免疫測定法であって、項2に記載の化合物を標準品として用いる方法。

【0026】

項5. 環境試料中のダイオキシン類の濃度又は毒性等量を算出するための免疫測定法であって、項2に記載の化合物を標準品として用いる方法。

【0027】

【発明の実施の形態】

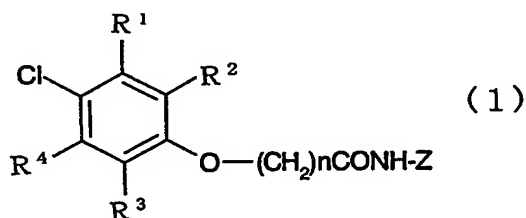
以下、本発明を詳細に説明する。

本発明の化合物

以下の一般式(1)で表される化合物は、文献未記載の新規化合物である。

【0028】

【化8】



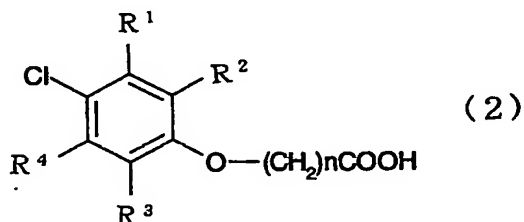
【0029】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 n は1～10の整数を表し、 Z はアミノ酸残基又はペプチドを表す。)

また、以下の一般式(2)で表される化合物は、上記一般式(1)で表される化合物の製造原料となる化合物であり、文献未記載の新規化合物である。

【0030】

【化9】



【0031】

(式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 n は1～10の整数を表す。)

好ましい化合物

上記一般式(1)又は(2)で表される化合物について、塩素置換位置は特に限定されないが、抗ダイオキシン抗体との反応性から、全置換塩素数が3以上である化合物が好ましく、 R^2 、 R^4 が塩素原子を表し R^1 及び R^3 が水素原子を表す化合物がより好ましい。

【0032】

上記一般式(1)で表される化合物について、ペプチドは、通常定義される構成アミノ酸残基数が100残基以内のものであれば特に限定されないが、好ましくは2～50残基、さらに好ましくは2～10残基のものを使用できる。

用途

上記一般式(1)で表される化合物は、抗ダイオキシン抗体と反応することから、ダイオキシン類の免疫測定用標準品として使用できる。さらに、この化合物は毒性等価係数(TEF)を有さないため、この化合物を標準品として用いることにより、測定者が安全に測定できるダイオキシン類免疫測定系を構築することができる。

製造方法

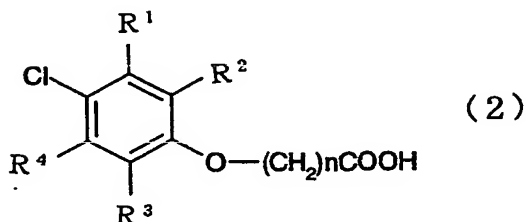
本発明のダイオキシン類測定用標準品は、それには限定されないが、例えば以下の方法で合成できる。

【0033】

以下の一般式(2)で表される化合物

【0034】

【化10】



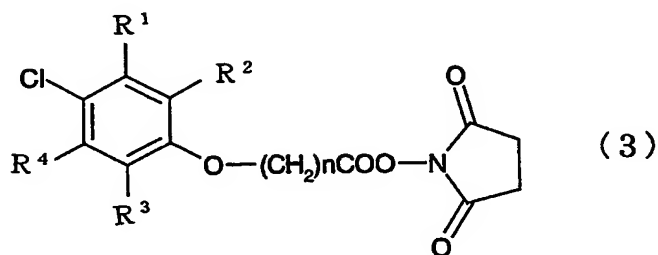
【0035】

(式中、式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 n は1～10の整数を表す。)

を、N-ヒドロキシスクシンイミドと反応させる活性化エステル法により活性化することにより、以下の一般式(3)で表される活性化エステル化合物

【0036】

【化11】



【0037】

(式中、式中、 R^1 、 R^2 、 R^3 、 R^4 は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、 n は1～10の整数を表す。)

を得る。

【0038】

次いで、これをアミノ酸またはペプチド等のアミノ基を含有する化合物と反応させることにより、上記の一般式(1)で表される化合物が得られる。

【0039】

出発原料である上記一般式(2)のクロロフェノール誘導体は、例えば以下の方法により合成することができる。クロロフェノール、炭酸カリウム及び6-ブロモヘキサン酸エチルエステルを60℃で16時間加熱攪拌し、反応終了後、酢酸エチルで抽出し減圧下で溶媒を濃縮する。残渣をエタノールで溶解し、水酸化ナトリウム水溶液を加え、室温で3時間攪拌する。反応終了後、濃塩酸で中和し、反応液を減圧濃縮後、濃塩酸を加えて酸性にし、酢酸エチルで抽出した後、再結晶を行うことにより、上記一般式(2)で表されるクロロフェノール誘導体が得られる。

免疫測定法

本発明方法は、ダイオキシン類を検出又は定量するための免疫測定法であって、上記一般式（１）で表される化合物を標準品として用いる方法である。より詳しくは、本発明方法は、環境試料中のダイオキシン類の濃度又は毒性等量を算出するための免疫測定法であって、上記一般式（１）で表される化合物を標準品として用いる方法である。

【0040】

すなわち、本発明のダイオキシン類免疫測定法は、上記一般式（１）で表されるクロロフェノール誘導体をダイオキシン類測定 of 標準品として用いることを特徴とし、それ以外は、通常の免疫測定法に従って実施することができる。

【0041】

本発明の化合物は公知のいずれの免疫測定法にも適用できる。このような公知の免疫測定法としては、例えばEIA、放射性免疫測定法（RIA）、蛍光免疫測定（FIA）等が挙げられる。測定の簡便さからEIAが好ましい。

【0042】

EIAには競合型測定法、非競合型測定法、均質法等があるが、ダイオキシン類は低分子化合物であるため、通常競合法により行なう。競合法には主にマイクロプレートのウェル、チューブ等に抗原を固定化する間接競合法と、ウェルやチューブ等に抗体を固定化する直接競合法がある。

【0043】

間接競合法では、ウェルに固定化する抗原としてハプテン化合物とキャリアー化合物の複合体を用いる。まずハプテン複合体をマイクロプレート等のウェルに固相化する。次いでウェルに抗原が結合していない部分を牛血清アルブミン、カゼイン等の市販のプロッキング剤でブロックする。このウェルに検体と一次抗体である抗ダイオキシン類抗体を加えて、検体と固相化抗原を抗体に対して競合反応させる。固相化抗原と結合しなかった抗体を洗浄除去後、同ウェルに二次抗体としてヤギ抗マウス免疫グロブリン抗体をペルオキシダーゼ（HRP）やアルカリフォスファターゼ（ALP）等の酵素で標識した酵素標識抗体を加えて、固相化抗原と結合した一次抗体と結合させる。緩衝液で数回洗浄した後、酵素基質を

加えて発色した酵素反応生成物の吸光度を測定する。

【0044】

酵素にペルオキシダーゼを用いる場合は、基質に過酸化水素、発色剤に o-フェニレンジアミンやテトラメチルベンジジン等を使用する。アルカリフォスファターゼでは、基質に p-ニトロフェニルリン酸が一般的に用いられる。

【0045】

直接競合法は、ウェルに抗体を固相化してブロッキングした後、別途調製したハプテン化合物と酵素を結合した酵素標識抗原と検体を加え、固相抗体と検体及び酵素標識抗体とを競合反応させる。抗体と結合しなかった標識抗原を洗浄除去し、酵素基質を加えて反応生成物の吸光度を測定する。

【0046】

上述の測定方法において、検体を添加しない反応溶液の吸光度に対し、検体を添加した反応溶液の吸光度の減少を阻害率として測定する。その際、既知濃度のダイオキシン類標準溶液より検量線を作成し、得られた検量線からダイオキシン類濃度を算出することができる。

【0047】

EIAで使用する抗体は、公知の方法に従ってダイオキシンをハプテン化し、牛血清アルブミン等のキャリアタンパク質に結合させたコンジュゲートを免疫用抗原として哺乳動物に免疫することにより作製することができる (Kun Chae, et al., J. Agric. Food., 25, 1207~1209 (1977); Simona G. Merica, et al., Can. J. Chem., 73, 826~834 (1995))。抗体はポリクローナル抗体、モノクローナル抗体のいずれでもよく特に限定されないが、抗体自身の均一性及び抗体製造時のロット差等の問題から、モノクローナル抗体であることが望ましい。

【0048】

本発明方法で使用する競合測定用抗原に代えて、ダイオキシンをハプテン化したもの、もしくはハプテン化ダイオキシンをキャリア担体に結合させたコンジュゲートも使用することができるが、本発明のクロロフェノール誘導体を競合反

応用抗原に用いることにより、より高感度にダイオキシン類が測定できる。

【0049】

すなわち、本発明の標準品代替化合物の末端に結合しているアミノ酸またはペプチド部分を牛血清アルブミン等のキャリアー担体に変えることにより固相化用抗原を作製することができ、またキャリアー担体の代わりに、ペルオキシダーゼやアルカリフォスファターゼ等の酵素、ローダミン等の蛍光物質や化学発光物質を使用することにより標識抗原を得ることができる。

【0050】

【実施例】

以下、実施例を挙げて本発明をさらに具体的に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

実施例 1 (ダイオキシン類免疫反応測定用標準品の作製)

上記一般式 (1) で示される本発明の化合物のうち、 R^2 、 R^4 が塩素原子を表し R^1 、 R^3 が水素原子を表す化合物を以下の方法により合成した。合成手順を図 1 を参照して説明する。

【0051】

アルゴン気流下で、2, 4, 5-トリクロロフェノール (1) (市販品) 15.0 g (76.0 mmol)、6-ブロモヘキサン酸エチルエステル 18.6 g (83.6 mmol)、炭酸カリウム 12.60 g (91.2 mmol)、無水ジメチルホルムアミド 150 ml を加え、60℃で一晩加熱攪拌した。反応終了後、室温まで冷却し、反応液を水 450 ml にあけ、酢酸エチル 225 ml で 2 回抽出した。硫酸マグネシウムを加え乾燥させた後、乾燥剤をろ別、有機層を濃縮し、粗生成物 30.7 g の淡黄色オイルを得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー (シリカゲル 450 g、展開溶媒 酢酸エチル : n-ヘキサン = 1 : 15) で精製し、6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル (2) を 26.5 g の透明オイルとして得た (収率 100%)。

【0052】

6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸エチル (2) をエタノール 200 ml に溶解し、続いて 2N-水酸化ナトリウム水溶液 200 ml を氷冷下

で滴下し、室温で3時間攪拌した。反応終了後、濃塩酸70mlで中和し、反応液を半分になるまで濃縮した。濃縮した反応液に濃塩酸5mlを加えて酸性にし、酢酸エチル100mlで1回、150mlで2回抽出した。次に水200ml、飽和塩化ナトリウム水溶液200mlの順で有機層を洗浄し、硫酸マグネシウムで乾燥した。乾燥剤をろ別し、有機層を濃縮して粗生成物23.3gの白色固体を得た。粗生成物にイソプロピルエーテル25ml、n-ヘキサン50mlを加えて再結晶し、析出結晶をろ取し、イソプロピルエーテル/n-ヘキサン=1/3で洗浄後、6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸(3)を21.4gの白色結晶として得た(収率88.0%)。

【0053】

6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸(3)18.2g (58.4mmol)を180mlの塩化メチレンに溶解し、1-エチル-3-(3'-ジエチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩12.7g (70.1mmol)とN-ヒドロキシスクシンイミド8.07g (70.1mmol)を加えた後、室温で一晩攪拌した。反応終了後、THF 1250mlに反応液を加え、水360ml、飽和炭酸水素ナトリウム水溶液540ml、水540mlの順に有機層を洗浄し、硫酸ナトリウムで乾燥後、乾燥剤をろ別し、有機層を濃縮して粗生成物21.9gの白色固体を得た。粗生成物をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(1回目:シリカゲル400g、展開溶媒 塩化メチレン、2回目:シリカゲル330g、展開溶媒 塩化メチレン)で精製し、スクシンイミジル-6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸ヘキサノエート(4)を9.73gの白色固体として得た(収率40.7%)。

【0054】

スクシンイミジル-6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ)ヘキサン酸ヘキサノエート(4)20mgを100mlのジメチルスルホキシドに溶解した。その後、50mMのグリシルグリシン水溶液100mlを徐々に添加し、室温で3時間攪拌してダイオキシシン類測定用標準品溶液を得た。

【0055】

また、上記操作において、出発原料として2, 4, 5-トリクロロフェノール

に代えて 2, 4, 6-トリクロロフェノール (市販品) を使用する他は同様にし、一般式 (1) において R^2 、 R^3 が塩素原子を表し R^1 、 R^4 が水素原子を表す化合物を合成した。

【0056】

また、上記操作において、出発原料として 2, 4, 5-トリクロロフェノールに代えて 3, 4, 5-トリクロロフェノール (市販品) を使用する他は同様にし、一般式 (1) において R^1 、 R^4 が塩素原子を表し R^2 、 R^3 が水素原子を表す化合物を合成した。

【0057】

実施例 2 (競合測定用抗原の作製)

実施例 1 で作製したスクシンイミジル-6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ) ヘキサノエート (4) と牛血清アルブミンを用いて競合測定用抗原を作製した。まず 50 mM リン酸緩衝液 (pH 8.0) に溶解した牛血清アルブミン (BSA) の溶液 1 ml (BSA 15 mg (2.27×10^{-7} mol) 相当分) を氷冷攪拌下、ジメチルスルホキシド 545.5 μ l を加え、その後スクシンイミジル-6-(2, 4, 5-トリクロロフェノキシ) ヘキサノエート (BB2-4) の 20 mM ジメチルスルホキシド溶液 454.5 μ l (40 等量 (9.09×10^{-6} mol)) を滴下し、室温 1 時間反応させた。反応後、4 L の PBS に対して透析を行い、競合測定用抗原を得た。

【0058】

実施例 3 (排ガス試料の調製及び公定法によるダイオキシン類 TEQ 値測定)

公定法 (JIS K0311) に準じてごみ焼却場の排ガスを採取し、高分解能ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) により試料中のダイオキシン類濃度を測定した。また、都市ごみ焼却場の煙道から、排ガス約 3 m³N をガス採取装置に吸引して採取し、採取した試料を、ろ紙、樹脂、吸収液などの形態ごとにトルエン、ジクロロメタン等の有機溶媒を用いて抽出した。これらの抽出液を合わせて 20 ml まで濃縮し、粗抽出液を得た。

【0059】

粗抽出液から 1 ml 分取し、それを硫酸処理、多層シリカゲルクロマトグラフ

処理および活性炭カラムクロマトグラフ処理を行って精製した後に、ガスクロマトグラフ質量分析計 (Micromass 社製) によって各ダイオキシン類異性体濃度を求めた。次に各ダイオキシン類異性体濃度に毒性等価係数 (TEF) を乗じて、排ガス試料中のダイオキシン類毒性等量 (TEQ) を算出した。

【0060】

一方、別に分取した粗抽出液 1 ml を硫酸処理および多層シリカゲルクロマトグラフ処理を行って精製した後、有機溶剤を乾固してジメチルスルホキシド (DMSO) 2 ml に転溶し、EIA 評価用試料とした。

【0061】

実施例 4 (抗ダイオキシンモノクローナル抗体を用いた排ガス試料の測定)

実施例 2 で作製した競合測定用抗原を PBS で $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように溶解し、96 穴アッセイプレート (Costar 社製, Cat No. 3590) の各ウェルに、この溶液を $100 \mu\text{l}$ ずつ分注し、プレートをシールで密閉して、 4°C で 18 時間静置して固相化を行なった。抗原溶液を除去後、0.05% Tween 20 を含む PBS にて 3 回洗浄し、5 倍希釈したブロッキング溶液 (ナカライテスク製) を $300 \mu\text{l}$ ずつ分注し、プレートをシールで密閉し、 4°C で一晩静置してブロッキングを行い、ダイオキシン類測定用プレートを作製した。このプレートを用いダイオキシン類の免疫測定を行なった。

【0062】

実施例 1 で作製したダイオキシン類標準品は、Triton X100 を 0.01% 含む 50% DMSO で、 $0 \sim 0.2 \mu\text{g}/\text{ml}$ の間で希釈系列を作製した。実施例 3 で調製した排ガス試料は DMSO に転溶後、Triton X100 を 0.01% 含む 50% DMSO で希釈を行い測定用試料とした。これら試料をダイオキシン類測定用プレートに $50 \mu\text{l}$ ずつ添加し、0.2% BSA を含む PBS で $0.1 \mu\text{g}/\text{ml}$ になるように希釈した抗ダイオキシンモノクローナル溶液を $50 \mu\text{l}$ ずつ添加し、 4°C で 1 時間反応させた。反応後、ウェルに添加した溶液を除去し、プレートを Tween 20 を 0.005% 含む PBS で 3 回洗浄した後、0.2% BSA を含む PBS で 2000 倍に希釈したヤギ抗マウス IgG (H+L) HRP 標識抗体 (アフィニティー精製、DAKO 社製) 100

μ l を分注した。プレートを室温で 1 時間静置した後、Tween 20 を 0.05% 含む PBS で 3 回洗浄し、各ウエルに HRP 基質である TMB (BioFX 社製) を 100 μ l ずつ分注し、30 分間室温で静置した。各ウエルに 100 μ l ずつ 0.5 M 硫酸溶液を添加し、マイクロタイター用分光光度計で波長 455 nm (対照 655 nm) の吸光度を測定した。

【0063】

得られた吸光度データより標準曲線を作成し、試料中のダイオキシン量を標準物質濃度に換算して算出した。得られた標準曲線を図 2 に示す。また実施例 3 の機器分析により得られたダイオキシン類毒性等量と本発明の標準品を用いて免疫測定を行なった結果の相関グラフを図 3 に示す。結果からもわかるように、本発明の免疫測定用標準品を用いた環境試料の免疫測定法による測定値と、公定法である機器分析法から算出されたダイオキシン類毒性等量との間に良好な相関性 ($R^2 = 0.97$) が認められた。

【0064】

【発明の効果】

本発明によれば、ダイオキシン類の免疫測定用標準品であって毒性等価係数 (TEF) を有さない標準品、及び、この標準品を用いて環境試料中のダイオキシン類濃度または毒性等量を簡便かつ高感度に測定できる免疫測定法が提供される。

【0065】

さらにいえば、本発明の免疫測定用標準品を用いたダイオキシン類の免疫測定系は、高感度でダイオキシン類の毒性等量が測定できる。このため環境分析等に広く応用することができ、食品、母乳、血液、尿といった生体試料の分析においても有用である。さらに、測定作業時の安全性を大幅に向上させることができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

実施例 1 によるダイオキシン類の免疫測定用標準品の合成スキームを示す図である。

【図 2】

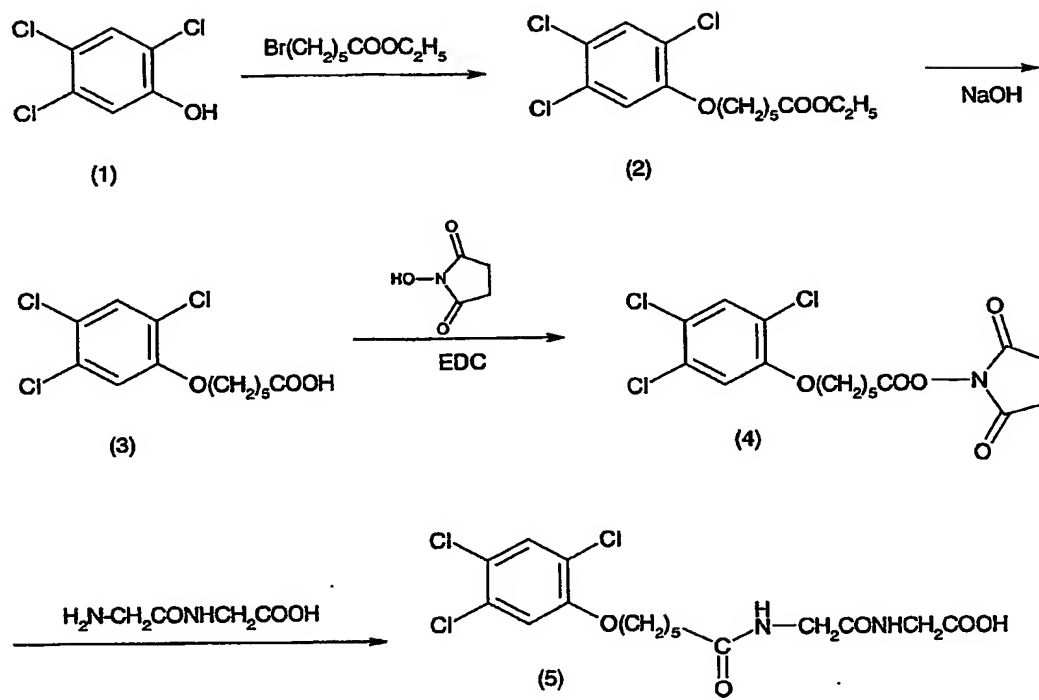
本発明の 1 実施例であるダイオキシン類免疫測定用標準品を用いて得られた標準曲線を示す図である。

【図 3】

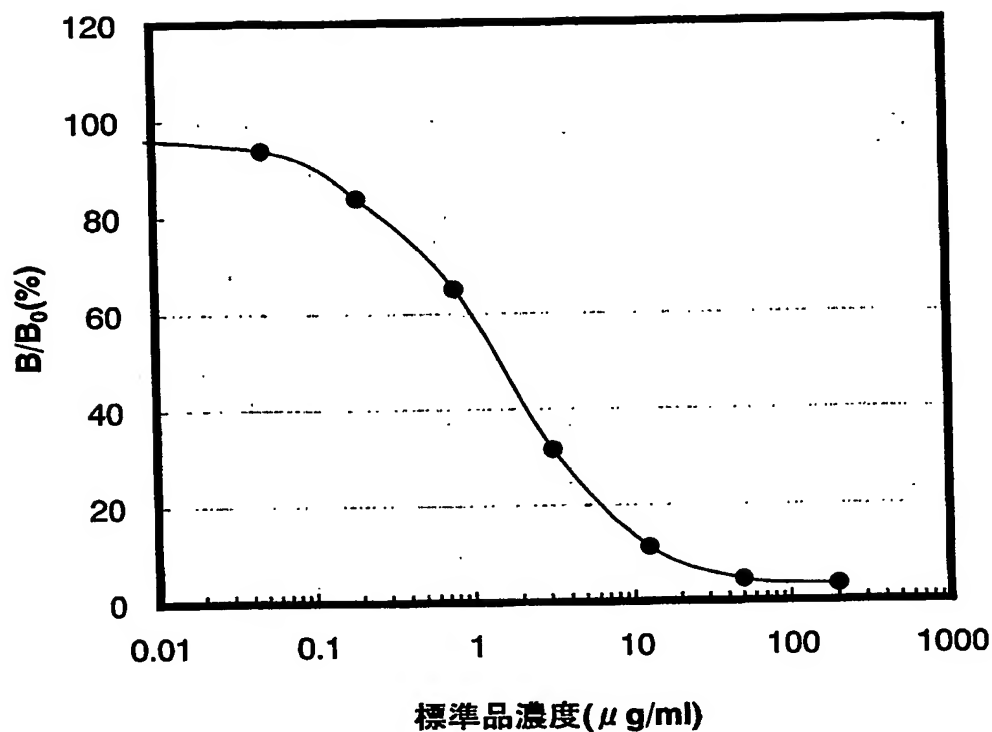
排ガス中のダイオキシン毒性等量の測定量について、公定法の結果と本発明のダイオキシン類免疫測定用標準品を用いた免疫測定法の結果との相関を示す図である。

【書類名】 図面

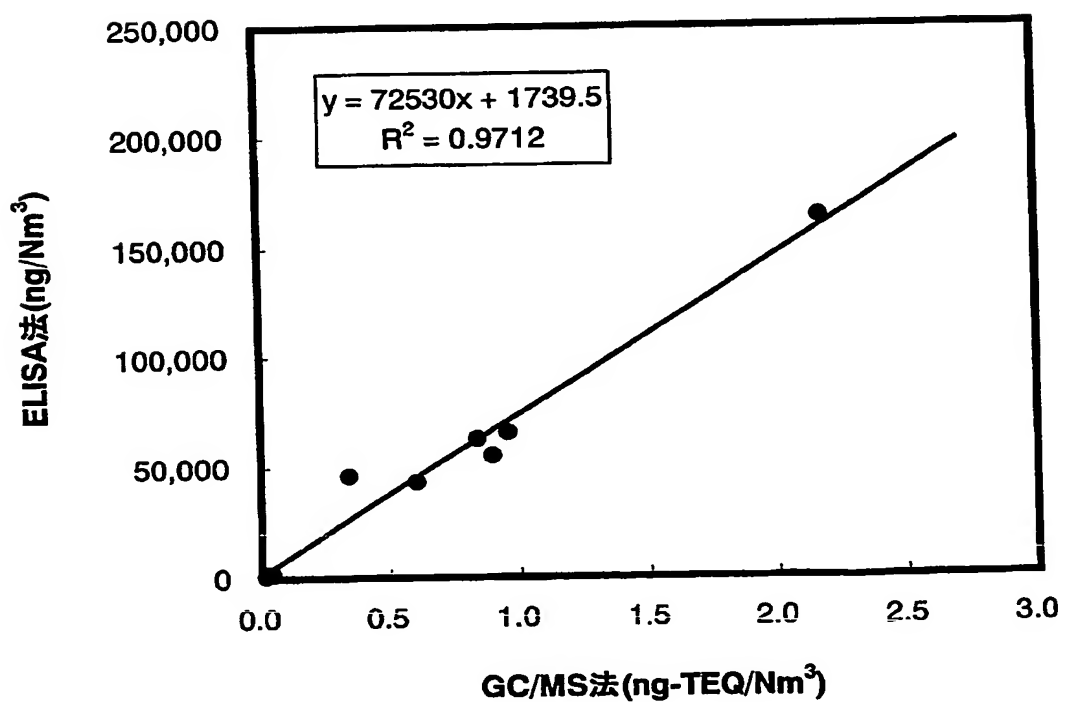
【図 1】



【図 2】



【図 3】



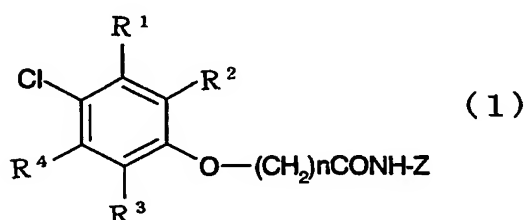
【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 ダイオキシン類の免疫測定用標準品であって毒性等価係数（TEF）を有さない標準品、及び、この標準品を用いて環境試料中のダイオキシン類濃度または毒性等量を簡便かつ高感度に測定できる免疫測定法を提供する。

【解決手段】 ①以下の一般式（1）で表される化合物。

【化1】



（式中、R¹、R²、R³、R⁴は、同一又は互いに異なって、塩素原子又は水素原子を表し、nは1～10の整数を表し、Zはアミノ酸残基又はペプチドを表す。

）この化合物は、ダイオキシン類の免疫測定用標準品として好適に使用できる。

②ダイオキシン類を検出又は定量するための免疫化学測定法であって、一般式（1）で表される化合物を標準品として用いる方法

【選択図】 図3

特願 2002-251616

出願人履歴情報

識別番号

[000003160]

1. 変更年月日

1990年 8月10日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜2丁目2番8号

氏 名

東洋紡績株式会社

特願 2 0 0 2 - 2 5 1 6 1 6

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 3 3 0 3 2]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 8 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 1 丁目 3 番 2 3 号

氏 名

株式会社タクマ

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.